

УДК 579.26:631.461

ОСОБЕННОСТИ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ

Н.В. ПАТЫКА,¹ Ю.В. КРУГЛОВ,¹ В.Ф. ПАТЫКА²

¹Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии

196608 Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины

03143 Киев, ул. Академика Заболотного, 154

Методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (tRFLP) проведен сравнительный филогенетический анализ по 16S рРНК комплекса прокариотических микроорганизмов подзолистых почв при сверхдлительном возделывании в звене севооборота различных сельскохозяйственных культур. Метод tRFLP дает возможность продемонстрировать и оценить бактериальное разнообразие в почвах, выявить новые генотипы почвенной микробиоты, некультивируемые или слабокультивируемые на селективных средах общепринятыми микробиологическими методами, в перспективе — глубже изучить экологию микробных сообществ почв.

Ключевые слова: микроорганизмы, сельскохозяйственные культуры, филогенетический анализ.

Микроорганизмы — неотъемлемый гомеостатический компонент почвы, который осуществляет и определяет в ней важнейшие функции трансформации веществ, энергии. Доминирующая часть микробных сообществ в почве представлена сложным комплексом различных морфотипов и физиологических групп. Структура микробных сообществ является неотъемлемой составной частью детальной характеристики почв, включая определенные процессы и факторы, прямо или косвенно влияющие на их особенности. Нам известно не более 10 % мира микроорганизмов. Например, количественная оценка бактериального населения почвы показала, что их численность превышает 4000 разновидностей (биовариантов) на 30 г почвы, что подтверждает сложность и важность изучения межбиотических взаимодействий всех компонентов природных сообществ, включая растения, а также применяемые агроприемы [2, 3, 12].

Микробиоте принадлежит важная роль в функционировании различных экосистем, однако развитию детального изучения микробного биоразнообразия в окружающей среде препятствовали ограниченные прикладные возможности. Это, в свою очередь, создавало дополнительные сложности для микробиологов, поскольку при оценке любым из известных методов большого количества разнообразных организмов и по-

лучении представлений об их экологической изменчивости необходимо проанализировать множество образцов. За прошедшее десятилетие в биологии широко развились молекулярные методы, с помощью которых можно преодолеть проблемы, возникающие в практике классических микробиологических методов исследований. Их использование в почвенной микробиологии показало, что во многих естественных условиях обитания биоразнообразие и сложность микробных сообществ, как и их пространственно-временная разнородность, гораздо более обширны, чем ожидалось первоначально.

Многие современные работы по изучению микробных сообществ базируются на исследованиях нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), непосредственно извлеченных из образцов различных почв [2, 6]. С помощью PCR с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.) изучаются и определяются гены, кодирующие рибосомальную РНК (рРНК). Это способствует дальнейшему развитию исследований разнообразных изолятов и некультивируемых видов микробных сообществ биогеоценозов [7, 8]. Основным инструментом филогенетического анализа является сравнение близких по структуре или по функции генов либо белков, прежде всего сравнение их первичных последовательностей. Анализ по 16S рРНК оказался более эффективным молекулярно-таксономическим инструментом оценки генетического разнообразия и отношений между бактериальными разновидностями, чем подходы, базирующиеся на фенотипических данных. Однако следует заметить, что и реконструкции с использованием разных молекулярных данных далеко не всегда согласуются не только с «морфологическими» реконструкциями, но и между собой. Основные предпосылки их расхождения заключаются в том, что на морфологическом уровне проявляется только малая часть генома. Используя комбинацию данных по изучению 16S рРНК, можно получить наглядные фингерпринты, подтвердить видовую принадлежность и филогенетические внутривидовые взаимосвязи [1, 13].

Цель настоящей работы — изучение методом tRFLP видовых изменений в прокариотическом комплексе подзолистой почвы при сверхдлительном сельскохозяйственном использовании.

Методика

Почвенные микробные сообщества изучали на базе сверхдлительного (с 1912 г.) стационарного полевого опыта Российского государственного аграрного университета Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева. Опытное поле находилось в центральной части Русской равнины, на окраине склона Клинско-Дмитровской гряды. Рельеф близлежащей территории представляет моренную равнину на водоразделе рек Москвы и Яузы, возвышается над уровнем р. Москвы на 60 м. Размер опытного участка 1,53 га с ровной макроповерхностью и небольшим уклоном (1 град) на северо-запад. Почвообразующие породы представлены четвертичными отложениями супесчаной и суглинистой бурой морены с прослойками (10–22) юрских глин. Международное название почвообразующей породы — суглинистая красно-бурая плейстоценовая морена.

Почва дерново-слабоподзолистая, старопашотная кислая и заплывающая (по классификации ФАО — Podsoluvisol). Согласно данным гра-

нулометрического анализа, в пахотном (0–20 см) слое почвы содержалось фракций <0,01 мм 22,0 % [11].

Образцы почв отбирали осенью после сбора урожая льносоломки (*Linum usitatissimum* L.) из верхнего 15-сантиметрового пахотного горизонта. Почвенные образцы для микробиологического анализа отбирали по следующим вариантам опыта:

- Севооборот*
1. Лен + NPK
 2. Озимая рожь + NPK
 3. Клевер + NPK
 4. Чистый пар.

ДНК почвенных микроорганизмов экстрагировали методом, описанным в работе [4]. Визуальную детекцию полученных образцов ДНК проводили после электрофоретического разделения в 1 %-м агарозном геле (рис. 1), после чего почвенную ДНК очищали от примесей гуминовых кислот по Морейра [10].

Полимеразную цепную реакцию выполняли флуоресцентно мечеными праймерами (рис. 2) Eu3, затем 1 мкл полученного продукта ПЦР рестрицировали ферментами *Hae*III и *Msp*I.

В автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000 определяли интенсивность флуоресценции терминального фрагмента. На основе полученных данных строили пик, который был пропорционален количеству

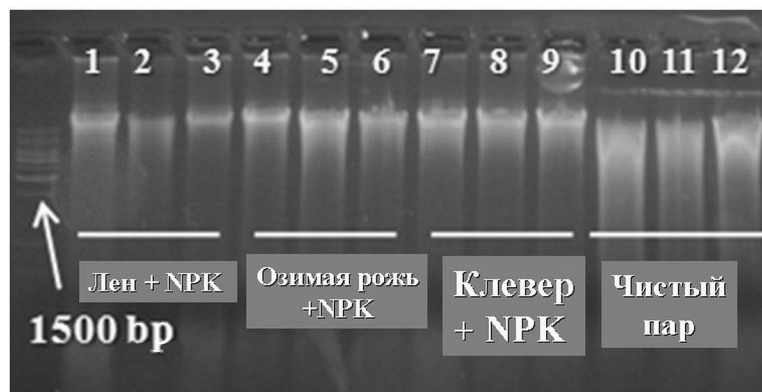


Рис. 1. Электрофореграмма totalной ДНК почвенных организмов. Здесь и на рис. 2: маркер молекулярных масс — 1500 bp; 1 — 12 повторности вариантов отбора

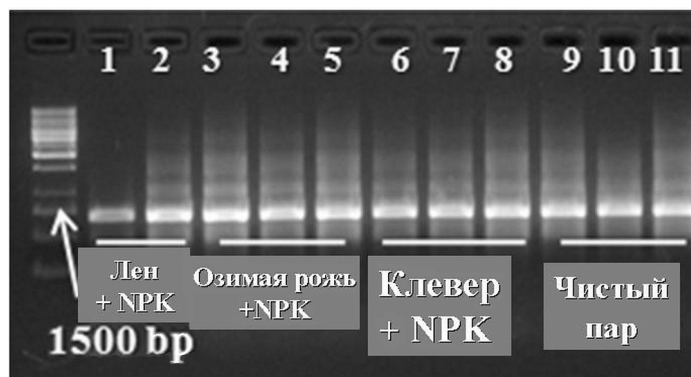


Рис. 2. Электрофореграмма 16S рRNA с флуоресцентно меченным праймером

ДНК и соответствовал геному каждой таксономической единицы в образце. Для видовой классификации фрагментов tRFLP использовали программу TRFLP Fragsort [9], на основе полученных видов по 16S рРНК проводили филогенетический анализ с помощью компьютерной программы Vector NTI.

Результаты и обсуждение

Анализ профилей tRFLP показал, что между ними существует значительная разница. Это отражается как в количестве обнаруженных генотипов, так и в структуре их распределения.

Топология распределения на дендрограмме прокариотических видов почвенного микробного комплекса в варианте культуры льна-долгунца в звене севооборота с применением минеральных удобрений (рис. 3) свидетельствует о наличии двух основных кластеров. Один из них состоит из шести подкластеров, соответствующих десяти доминирующим генотипам, большую часть из которых составляют некультивиру-

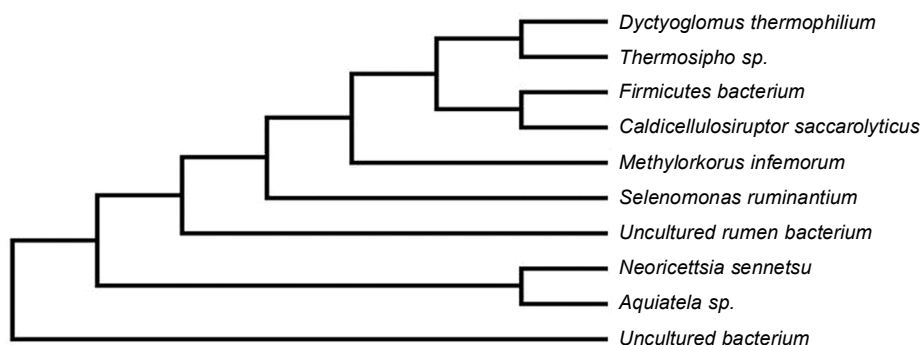


Рис. 3. Влияние сверхдлительной культуры льна-долгунца в звене севооборота с применением минеральных удобрений на разнообразии прокариот в подзолистой почве

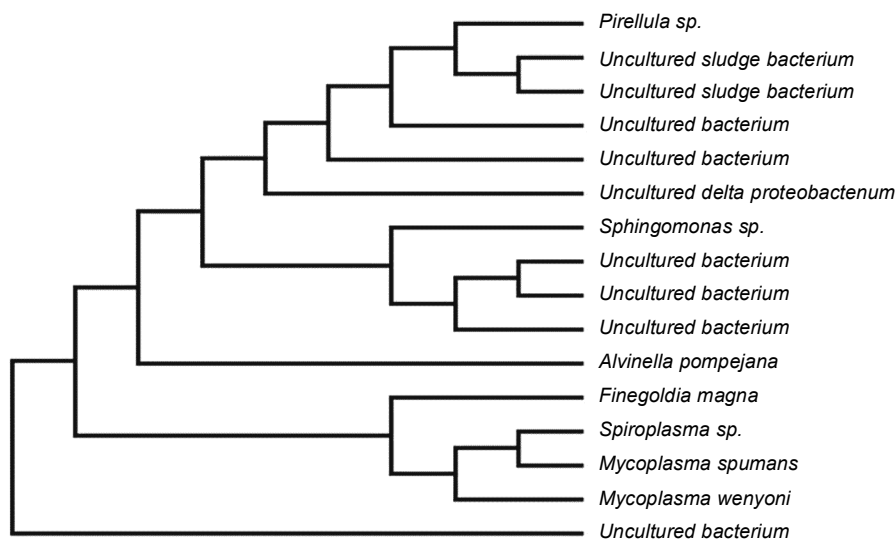


Рис. 4. Влияние сверхдлительной культуры озимой ржи в звене севооборота с применением минеральных удобрений на разнообразии прокариот в подзолистой почве

емые виды и виды почвенных бактерий, относящиеся к представителям родов *Dyctyoglomus*, *Thermosipho*, *Firmicutes*, *Caldicellulosiruptor*, *Methylorkorus*, *Selenomonas*, *Neoricettsia* и *Aquitalea*. При ротации культур в севообороте в этом варианте на фоне минерального питания наблюдалось большее видовое биоразнообразие среди доминирующих видов.

Топология распределения на дендрограмме прокариотических видов почвенного микробного комплекса в варианте культуры озимой ржи в звене севооборота с применением минеральных удобрений (рис. 4) свидетельствует о наличии пяти основных кластеров, три из которых состоят из четырех и один из шести подкластеров, вместе соответствующих 16 доминирующим генотипам. Большую часть из последних составляют некультивируемые виды и виды почвенных бактерий, относящиеся к представителям родов *Pirellula*, *Spingomonas*, *Alvinella*, *Finegoldia*, *Spiroplasma* и *Mycoplasma*. По сравнению со льном существенно увеличилось видовое биоразнообразие при возделывании в севообороте озимой ржи, причем особые различия наблюдались по генетическому видовому разнообразию, что подтверждает разнонаправленность почвенных процессов и активизацию до доминирующего состояния большего количества разных видов прокариотического микробного комплекса.

Топология распределения на дендрограмме прокариотических видов почвенного микробного комплекса в варианте культуры клевера в звене севооборота с применением минеральных удобрений (рис. 5) свидетельствует о наличии пяти основных кластеров, три из которых состоят из четырех, шести и девяти подкластеров, соответствующих 28 домини-

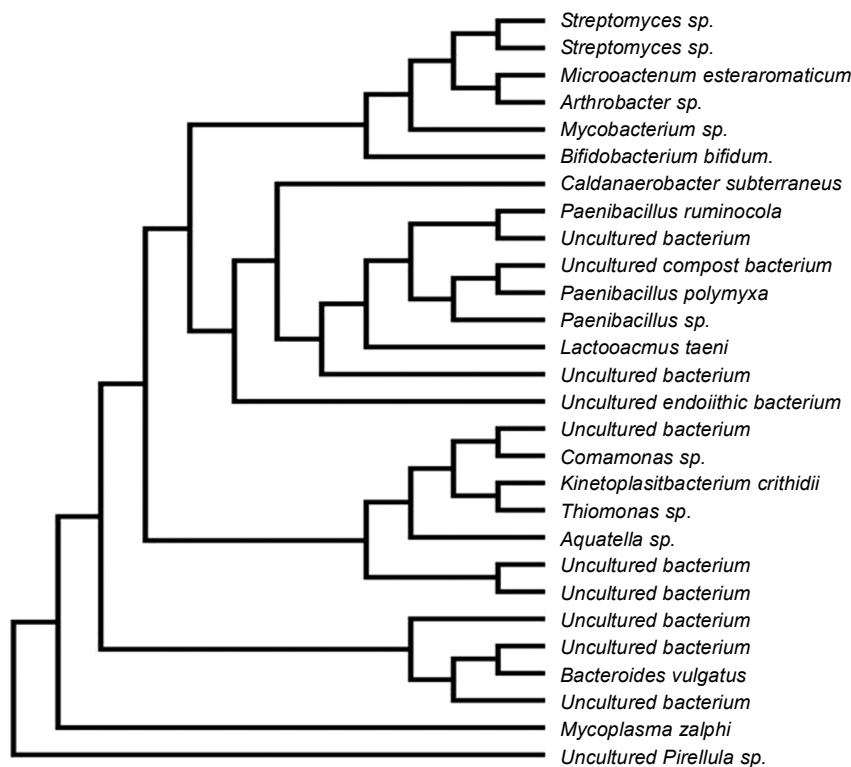


Рис. 5. Влияние сверхдлительной культуры клевера в звене севооборота с применением минеральных удобрений на разнообразие прокариот в подзолистой почве

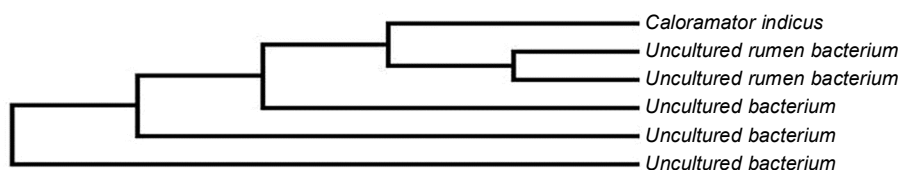


Рис. 6. Влияние чистого пара без применения минеральных удобрений на разнообразии прокариот в подзолистой почве

рующим генотипам. Большую часть последних составляют некультивируемые виды и виды почвенных бактерий, относящихся к представителям родов *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bifidobacterium*, *Caldanaerobacter*, *Paenibacillus*, *Comamonas*, *Thiomonas*, *Aquitalea*, *Bacteroides*, *Mycoplasma* и *Pirellula*. В этом варианте по сравнению с другими изучаемыми агрофонами и культурами разнообразие доминирующих видов было наивысшим, что связано с восстановлением благоприятного питательного режима для развития почвенных микроорганизмов.

Результаты распределения на дендрограмме прокариотических видов почвенного микробного комплекса в варианте чистого пара без применения минеральных удобрений (рис. 6) подтверждают наличие трех основных кластеров, один из которых состоит из четырех подкластеров, соответствующих шести доминирующим генотипам. Большую часть последних составляют некультивируемые виды и виды почвенных бактерий родов *Caloramator* и *Rumen*. По количеству доминирующих видов вариант чистого пара не превышал бессменных исследуемых культур, а по количеству кластерных доминирующих видов приближался к севооборотным вариантам.

Таким образом, на формирование структуры микробного комплекса почвы под посевами сельскохозяйственных культур существенно влияет история поля (севооборот, агротехнические мероприятия и др.). В условиях севооборота изменяется видовой состав бактериального комплекса, его структура, наблюдается смена доминирующих форм. В чистом пара снижается генетическое разнообразие прокариот. Методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (tRFLP) можно оценить и сравнить структуры микробных сообществ. Это позволит продемонстрировать бактериальное разнообразие в почвах, выявить новые генотипы почвенной микробиоты, некультивируемые или слабокультивируемые на селективных средах общепринятыми микробиологическими методами; в перспективе — глубже изучить экологию микробных сообществ и провести микробиологический мониторинг почв.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-04-13527 офи_ц.

1. Длительному полевому опыту ТСХА 90 лет: итоги научных исследований / Под ред. А.Ф. Сафонова. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. — 246 с.
2. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. ed. / Ed. D.R. Boone, R.W. Castenholz. — N.Y., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. — 2001. — V. 1. — 721 p.
3. *Buckley D.H., Schmidt T.M.* The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation // *Microbial. Ecol.* — 2001. — **42**. — P. 11–21.
4. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. — 1987. — **12**. — P. 13–15.
5. *Duarte G.F., Rosado A.S., Seldin L. et al.* Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community // *J. Microbiol. Methods*. — 1998. — **32**. — P. 21–29.

6. *Felske A., Wolterink A., Van Lis R. et al.* Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rDNA levels of the predominant ribotypes // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — **66**. — P. 3998–4003.
7. *Hugenholz P., Goebel B.M., Pace N.R.* Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // *J. Bacteriol.* — 1998. — **180**, N 18. — P. 4765–4774.
8. *Marsh T.L.* Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — **2**. — P. 323–327.
9. *Michel Jr., Marsh T.L., Reddy C.A.* Characterization of microbial community structure during composting using analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rDNA genes // *Microbiol. Composting.* — Heidelberg: Springer-Verlag., 2002. — P. 25–42.
10. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // *Nucl. Acids Res.* — 1998. — **26**, N 13. — P. 3309–3310.
11. *Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J.* The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences // *Adv. Microbial. Ecol.* — 1986. — **9**. — P. 1–55.
12. *Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L.* High diversity in DNA of soil bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1990. — **56**. — P. 782–787.
13. *Widmer F., Fliessbach A., Laczko E. et al.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA- and BiologTM-analyses // *Soil. Biol. Biochem.* — 2001. — **33**. — P. 1029–1036.

Получено 20.01.2009

ОСОБЛИВОСТІ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ПРОФІЛІВ ПРОКАРІОТИЧНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІДЗОЛИСТИХ ҐРУНТІВ

М.В. Патыка,¹ Ю.В. Круглов,¹ В.Ф. Патыка²

¹Державний науковий заклад Всеросійський НДІ сільськогосподарської мікробіології, Санкт-Петербург, Пушкін

²Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України, Київ

Методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (tRFLP) проведено порівняльний філогенетичний аналіз за 16S rDNA комплексу прокаріотичних мікроорганізмів підзолистих ґрунтів за надтривалого обробітку в ланці сівозміни різних сільськогосподарських культур. Метод tRFLP дає змогу продемонструвати й оцінити бактеріальне різноманіття у ґрунтах, виявити нові генотипи ґрунтової мікробіоти, які не культивуються чи слабокультивуються на елективних середовищах загальноприйнятими мікробіологічними методами, у перспективі — глибше вивчати екологію мікробних угруповань ґрунтів.

FEATURES OF PHYLOGENETIC PROFILES OF PROKARIOTIC MICROORGANISMS OF PODSOLIC SOILS

N.V. Patyka,¹ Y.V. Kruglov,¹ V.F. Patyka²

¹State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology
3, Podbelskogo Av., Pushkin, St. Petersburg, Russia

²D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of
Ukraine
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

Using a method of polymorphism of lengths restrictions fragments (tRFLP) it is spent on 16S rDNA the comparative phylogenetic analysis of a complex prokariotic microorganisms of podsolitic soils at superlong term cultivation in a link of various agricultural crops rotation. The method tRFLP gives the chance to demonstrate and evaluate a bacterial variety in soils, to see new genotypes of soil microbiotic, not cultivated on selective mediums with the standard microbiological methods, and to study ecology of microbic communities of soils more deeply.

Key words: microorganisms, agricultural crops, phylogenetic analysis.